

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-057895

(43)Date of publication of application : 06.03.2001

(51)Int.CI.

C12P 7/62

(21)Application number : 11-233656

(71)Applicant : KANEYAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 20.08.1999

(72)Inventor : ODAWARA OSAMU
MIYAMOTO KENJI
YOKOMIZO SATOSHI
MATSUMOTO KEIJI

(54) EXTRACTION OF 3-HYDROXYALKANOIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently extract and separate the subject compound by adding a divalent or polyvalent metal salt and a surfactant to a suspension of a microbial cell of a poly-3-hydroxyalkanoic acid-containing microorganism in an extraction solvent and flocculating and removing an undissolved cell residue.

SOLUTION: A divalent or polyvalent metal salt (e.g. calcium chloride, etc.), and/or a surfactant (e.g. benzyltrimethylammonium chloride, etc.), is added to a suspension of a microbial cell of poly-3-hydroxyalkanoic acid (PHA)-containing microorganism [e.g. Aicaligenes eutrophus A32C (FERM P-15786) strain into which a PHA synthase gene derived from Aeromonas caviae is transferred, etc.], and an extraction solvent (e.g. chloroform, etc.), and undissolved cell residue is flocculated and removed from the PHA-containing solution to readily obtain a high-purity poly-3-hydroxyalkanoic acid useful as a biodegradable plastic, etc., in an improved efficiency of industrial production at a low cost.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 06.08.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-57895

(P2001-57895A)

(43)公開日 平成13年3月6日 (2001.3.6)

(51)Int.Cl.
C 12 P 7/62

識別記号

F I
C 12 P 7/62

テ-マ-ト*(参考)
4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全5頁)

(21)出願番号 特願平11-233656	(71)出願人 鐘淵化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
(22)出願日 平成11年8月20日(1999.8.20)	(72)発明者 小田原 修 兵庫県高砂市西畑1丁目13番1-303
	(72)発明者 宮本 慶二 兵庫県明石市別所町12-32メゾン別所201
	(72)発明者 横溝 聰 兵庫県神戸市垂水区塩屋町6-31-17三青荘
	(72)発明者 松本 圭司 兵庫県西宮市大森町11-33
	Fターム(参考) 4B064 AD03 CA02 CA19 CC03 CC24 CD02 CE08 CE20 DA16

(54)【発明の名称】 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の抽出方法

(57)【要約】

【課題】 PHAを含有する微生物菌体からの、 PHAの抽出分離を行うための抽出方法を提供すること。

【解決手段】 PHAを含有する微生物菌体と抽出溶媒との懸濁液に、金属塩およびまたは界面活性剤を添加して、未溶解細胞残渣を凝集させて除去することによって、効率よく PHA溶液を分離することを特徴とする PHAの抽出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物菌体と抽出溶媒の懸濁液に、2価以上の金属塩および/または界面活性剤を添加して、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含む溶液から未溶解細胞残渣を凝集させて除去することを特徴とするポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の抽出分離方法。

【請求項2】界面活性剤が陽イオン性である請求項1記載のポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の抽出分離方法。

【請求項3】ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物が、アエロモナス・キャビエ由来のポリ-3-ヒドロキシアルカン酸合成酵素群遺伝子が導入された菌株である請求項1または2記載の抽出分離方法。

【請求項4】ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸が、D-3-ヒドロキシブチレート(3HB)とD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との2成分共重合体、または、D-3-ヒドロキシブチレート(3HB)とD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HV)とD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との3成分共重合体である請求項1～3記載の抽出分離方法。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の、微生物菌体からの抽出分離方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】現在、プラスチック廃棄物は焼却、埋め立てなどにより処理されているが、これらの処理方法には地球の温暖化や埋め立て地の地盤弛緩等の問題点がある。そのためプラスチックリサイクルへの社会意識の高まりとともに、リサイクルシステム化が進みつつある。しかし、リサイクル可能な用途には限りがあり、実際問題としてプラスチック廃棄処理方法としては、焼却、埋め立て、リサイクルだけでは対応しきれず、自然界に放置されたままになるものも多い。そこで、廃棄後は自然界の物質循環に取り込まれ、分解生成物が有害とならない生分解性プラスチックが注目されており、その実用化が切望されている。

【0003】これら生分解プラスチックの中でも、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸(以後PHAと称す)は多くの微生物種の菌体内にエネルギー蓄積物質として生成、蓄積される生分解性を有する熱可塑性ポリエステルであり、自然界の炭素循環プロセスに取り込まれることから生態系への悪影響がほとんどないと予想されているために、特に注目されている。また、医療分野においても、回収不要のインプラント材料、薬物担体としての利用が可能であると考えられている。

【0004】微生物によって生成されたPHAは、顆粒体を形成して菌体内に蓄積されており、これらをプラス

チックとして利用するためには、微生物の菌体内から分離して取り出す必要がある。PHAを微生物菌体から分離精製する既知の方法として、大別すると、PHAが可溶である有機溶剤にPHAを溶解させて抽出する方法と、PHA以外の菌体構成成分を可溶化させて除くことによりPHAを得る方法がある。

【0005】有機溶媒を用いたPHAの抽出分離方法としては、例えば1,2-ジクロロエタンやクロロホルムといった疎水性のハロゲン含有炭化水素を抽出溶媒として用いる方法(特開昭55-118394号、特開昭57-65193号)、また、ジオキサン(特開昭63-198991号)またはプロパンジオール(特開平02-69187号)またはテトラヒドロフラン(特開平07-79788号)の様な親水性の抽出溶媒を用いた方法が提案されている。しかし、これらの方法においてはPHAを実用に倣する濃度まで溶解しようとすると、その抽出液は極めて粘重となり、抽出溶媒に溶解しなかった菌体残渣とPHAを含む溶媒層との分離が非常に困難であるという欠点を有している。

【0006】一方、PHA以外の菌体構成成分を可溶化させて除くことによりPHAを得る方法もいくつか提案されているが(J. Gen. Microbiology, 19, 198-209頁(1958)、特公平04-61638号、特表平08-502415号、特開平07-177894号)、PHAの著しい低分子化が起こったり、得られるPHAの純度が低い等の問題点を有する上に、処理工程が多く複雑であったり、毒性の高い薬品を必要とする、あるいはコストが極めて高くなるなど、いずれも、実用には適さない方法であるのが現状である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、微生物菌体からのPHAの抽出において、抽出溶媒に溶解しなかった菌体残渣とPHAを含む溶媒層とを効率よく分離する方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、PHAを工業的有利に生産できる方法について鋭意検討した結果、PHAを含有する微生物菌体と抽出溶媒の懸濁液に、2価以上の金属塩、または界面活性剤を添加することにより、抽出液に溶解しなかった細胞残渣を凝集させ、効率よく分離除去できることを見いだし、本発明に到達した。

【0009】即ち、本発明は、PHAを含有する微生物菌体と抽出溶媒の懸濁液に、2価以上の金属塩および/または界面活性剤を添加して、PHAを含む溶液から未溶解細胞残渣を凝集させて除去することを特徴とするPHAの抽出分離方法に関する。

【0010】好ましい実施態様としては、界面活性剤が陽イオン性である上記抽出分離方法に関する。

【0011】別の好ましい実施態様としては、PHAを含有する微生物が、アエロモナス・キャビエ由来のPHA合成酵素群遺伝子が導入された菌株である上記抽出分離方法に関する。

【0012】更に別の好ましい実施態様としては、PHAが、3HBと3HHとの2成分共重合体、または、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体である上記抽出分離方法に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明に用いる微生物は、細胞内にPHAを蓄積している微生物であれば特に限定されない。例えば、アルカリゲネス・リポリチカ (*Aicaligenes lipolytica*)、アルカリゲネス・ユウトロファス (*Aicaligenes eutrophus*)、アルカリゲネス・ラタス (*Aicaligenes latas*) 等のアルカリゲネス属 (*Aicaligenes*)、シュウドモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、アゾトバクター属 (*Azotobacter*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、アエロモナス属 (*Aeromonas*) の菌が挙げられ、中でも、アロエモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 等の菌株、または、アエロモナス・キャビエ由来のPHA合成酵素群の遺伝子が導入された菌株、例えば、アルカリゲネス・ユウトロファスA32C (寄託番号FERM P-15786) 等がより好ましい。

【0014】これらの微生物の培養方法は、PHAを多量に効率よく菌体内に蓄積できるものであれば特に限定ではなく、例えば、前記アルカリゲネス・ユウトロファスA32C (FERM P-15786) を用いる場合には、J. Bacteriol., 179, 4821-4880頁 (1997) 等に記載の方法が好ましい。

【0015】本発明におけるポリ-3-ヒドロキシアルカン酸 (PHA) とは、特に限定されないが、D-3-ヒドロキシブチレート (3HB) のホモポリマーや3HBと他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体が好ましく、更には、3HBとD-3-ヒドロキシヘキサノエート (3HH) との2成分共重合体 (*Macromolecules*, 28, 4822-4828 (1995)) または、3HBとD-3-ヒドロキシバレート (3HV) と3HHとの3成分共重合体 (特開平08-289797号) などが、物性の面からより好ましい。ここで、3HBと3HHの2成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、3HBユニットの含有量が1~99モル%といった組成比のものが好適である。また、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、例えば、3HBユニット含有量が1~95モル%、3HVユニット含有量が1~96モル%、3HHユ

10

20

30

40

50

ニット含有量が1~30モル%といった組成比のものが好適である。またこれらPHAの分子量は10万以上が好ましく、50万以上がより好ましい。

【0016】PHAの微生物菌体中の含有率は、高い方が好ましいのは当然であり、工業レベルでの適用においては乾燥菌体中に20重量%以上が好ましく、抽出操作、分離操作、分離ポリマーの純度等を考慮すると50重量%以上が特に好ましい。本発明においては、前記のようにして培養して得られた微生物菌体を、培養液から分離した湿菌体としてそのまま用いても良いし、または湿菌体を凍結乾燥機等で乾燥処理して乾燥菌体として用いても良い。さらには、ミルや高圧ホモジナイザー等の物理的破碎処理、界面活性剤、次亜塩素酸ナトリウムや有機溶剤等の化学処理で菌体の一部を破壊し、または菌体の一部を除去してPHAの含有量を高めたものを用いても良い。

【0017】本発明で使用するPHAの抽出溶媒としては、PHAが溶解するものであれば特に限定されず、例えば、クロロホルム、塩化メチレン、1, 2-ジクロロエタン、ピリジン、1, 2-ブロビレンカーボネットのような環式カーボネット類、テトラヒドロフラン、乳酸エチルやアセトニトリル等やこれらの溶媒の混合物、例えばクロロホルムとメタノールの混合物やクロロホルムとテトラヒドロフランの混合物等の混合溶媒系が挙げられる。

【0018】本発明で使用する金属塩としては、2価以上の金属イオンと、一般的な対イオンからなる金属塩であれば特に限定されず、例えば、金属イオンとしては、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、アルミニウム、バリウム、マンガン、銅、コバルト等が挙げられ、対イオンとしては、塩化物イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、硝酸イオン、炭酸イオン等が挙げられ、金属塩の具体的な例としては、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化第一鉄、塩化第二鉄、塩化亜鉛、塩化バリウム、塩化コバルト、塩化銅、塩化マンガン、塩化アルミニウム、硫酸マグネシウム、硫酸亜鉛、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム等が例示できる。また、本発明で使用される界面活性剤としては、陰イオン性、陽イオン性、両性もしくは非イオン性でも良いが、好ましくは陽イオン性界面活性剤であり、具体的には、セチルトリメチルアンモニウムプロミド、デシルビリジニウムクロリド、テトラデシルアンモニウムプロミド、セチルビリジニウムクロリド、トリエチルヘキシルアンモニウムプロミド、4, 4-トリメチレンビス(1-メチルビペリデン)、トリメチルフェニルアンモニウムプロミド、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミド、アセタミン86(花王株式会社製)コータミン24P(花王株式会社製)等が挙げられる。

【0019】本発明で使用する金属塩や界面活性剤の添

加量は特に制限されないが、微生物菌体懸濁液 1 Lあたり 0.001 ~ 1.0 重量% の範囲の濃度となるように添加するのが好ましく、さらには、0.01 ~ 5 重量% の範囲の濃度がより好ましい。0.001 重量% 以下の濃度では効果が低く、1.0 重量% を超える濃度の場合、コストの面から好ましくない。

【0020】本発明においては、上記金属塩と界面活性剤をいずれか単独で使用しても良いし、併用しても良い。金属塩や界面活性剤の投入方法は、液体や固体のまま菌体懸濁液に投入し溶解させても良いし、あらかじめ溶液としたち菌体懸濁液に投入しても良い。金属塩や界面活性剤の投入に際しては菌体懸濁液内の金属塩や界面活性剤の分散を促進させるために菌体懸濁液を攪拌したほうが好ましい。微生物菌体の未溶解細胞残渣を凝集させるための攪拌時間、攪拌温度については適宜設定できる。

【0021】本発明においては、PHAを含有する微生物菌体と抽出溶媒との懸濁液に、上記のように金属塩や界面活性剤を添加処理することで、懸濁液中の未溶解細胞残渣が凝集するために、PHA溶液を容易に分離することが出来る。ここで利用できる分離操作は、特に限定されないが、例えば、ろ過、デカンテーション、遠心分離機や膜分離などを一般に知られている方法が利用できる。ろ過による分離操作については一般に用いられるろ材、具体的にはろ紙、ろ布、網（メッシュ）、多孔性セラミック、多孔性金属板、多孔性フィルムなどが利用できる。デカンテーションによる分離操作としては例えば、微生物懸濁液を攪拌後、5分から2時間、好ましくは10分から1時間静置し、適当な方法、たとえば吸引機などで懸濁液上部の澄んだ溶液を回収すればよい。遠心分離器による分離操作については一般に知られている条件を利用でき、遠心分離器は回分式、連続式どちらでも利用できる。

【0022】この様にして未溶解細胞残渣と分離して得られたPHA溶液のポリマー純度は非常に高く、これを公知の方法で溶媒を除去すれば高純度のPHAを得ることが出来る。もちろん目的に応じて、結晶化やその他の精製方法を用いて更に純度を向上させることも出来る。

【0023】

【実施例】以下実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0024】（実施例1）アエロモナス・キャビエ由來のPHA合成酵素群遺伝子を導入したアルカリゲネス・ユウトロファス AC32（寄託番号FERM P-15786）株を、J. Bacteriol., 179, 4821-4830項（1997）に記載の方法で培養し（培地：Na₂HPO₄·12H₂O 11.3g, KH₂PO₄ 1.9g, (NH₄)₂SO₄ 6g, プロエキス（播州調味料（株）製 10g, MgSO₄·7H₂O 1g, ヤシ油 50g, 微量金属元素溶液（組成：FeCl₃·6H₂O 16.2g, CaCl₂·2H₂O 10.3g, CoCl₂·6H₂O 0.2g, Ni

Cl₂·6H₂O 0.1g, CrCl₃·6H₂O 16.2g, CuSO₄·5H₂O 0.2g / 1L 0.1N-HCl) 5ml / 1L, pH 6.7, 培養温度30°C, 培養時間72時間）、3HBと3HHとの2成分共重合体（3HBユニット：3HHユニット = 90 : 10（モル比）、分子量 約100万）を約50重量%含有した菌体を得た。これを遠心分離処理（5000 rpm, 10 min）して培養液から分離し、湿菌体とした。この湿菌体を凍結乾燥し、乾燥菌体としたのちに、乾燥菌体で50g / l となるようにクロロホルムに懸濁し、室温で5時間攪拌を行って3HBと3HHとの2成分共重合体の抽出を行った。この微生物菌体を含む抽出液に、陽イオン界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを10g / l となるように加えて更に1時間攪拌し未溶解細胞残渣を凝集させ、これをろ紙（桐山製作所製、No. 4）を用いて桐山ロートにて吸引ろ過し、凝集菌体残渣を分離除去した。この時目詰まりすることなくろ過を行うことが出来た。得られた濾液に、攪拌しながらメタノールを加えて3HBと3HHとの2成分共重合体の結晶を析出させ、該結晶をろ過により集め減圧下に乾燥した。得られた3HBと3HHとの2成分共重合体の回収率を計算したところ、98%であった。

【0025】（実施例2）実施例1において、陽イオン性界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドをヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミドに変更した以外は同様の操作を行った。得られた3HBと3HHとの2成分共重合体の回収率は96%であった。

【0026】（実施例3）実施例1において、抽出溶媒をクロロホルムからテトラヒドロフランに変更した以外は同様の操作を行った。得られた3HBと3HHとの2成分共重合体の回収率は87%であった。

【0027】（実施例4）実施例1で得られた湿菌体を、乾燥することなく50g / l となるようにテトラヒドロフランに懸濁し、加熱還流下で5時間攪拌を行って3HBと3HHとの2成分共重合体の抽出を行った。この微生物菌体を含む抽出液に、塩化カルシウムを10g / l となるように加えて更に1時間攪拌し未溶解細胞残渣を凝集させ、これをろ紙（桐山製作所製、No. 4）を用いて桐山ロートにて吸引ろ過し、凝集菌体残渣を分離除去した。この時目詰まりすることなくろ過を行うことが出来た。得られた濾液を、攪拌しながら室温まで冷却し、3HBと3HHとの2成分共重合体の結晶を析出させ、該結晶をろ過により集め減圧下に乾燥した。得られた3HBと3HHとの2成分共重合体の回収率は80%であった。

【0028】（実施例5）実施例4において、塩化カルシウムをベンジルトリメチルアンモニウムクロリドに変更した以外は同様の操作を行った。得られた3HBと3HHとの2成分共重合体の回収率は83%であった。

【0029】（実施例6）アルカリゲネス・ユウトロフ

アス (ATCC 17699) 株を、グルコースを炭素源として培養し (培地: グルコース 20g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9g, KH_2PO_4 1.5g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 微量金属元素溶液 (組成: $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 16.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10.3g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 16.2g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2g / 1L 0.1N-HCl) 5ml / 1L, pH 6.8, 培養温度 30°C, 培養時間 48 時間), 3HB のホモポリマー (3HB ユニット 100%) を菌体内に約 60 重量% 含有した菌体を得た。これを遠心分離処理 (5000 rpm, 10 min) して培養液から分離し、湿菌体とした。この湿菌体を凍結乾燥し、乾燥菌体としたのちに、乾燥菌体で 5.0 g / 1 となるようにクロロホルムに懸濁し、室温で 5 時間攪拌を行って 3HB ホモポリマーの抽出を行った。この微生物菌体を含む抽出液に、陽イオン性界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを 1.0 g / 1 となるように加えて更に 1 時間攪拌しクロロホルムに溶解しない細胞残査を凝集させ、これをろ紙 (桐山製作所製、No. 4) を用いて桐山ロートにて吸引ろ過し、凝集菌体残査を分離除去した。この時目詰まりすることなく、ろ過を行うことが出来た。得られた濾液に、攪拌しながらメタノールを加えて 3HB ホモポリマーの結晶を析出させ、該結晶をろ過により集め減圧下に乾燥した。得られた 3HB ホモポリマーの回収率を計算したところ、95% であった。

【0030】(実施例 7) 実施例 6において、陽イオン性界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドをヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミドに変更した以外は同様の操作を行った。得られた 3HB ホモポリマーの回収率は 94% であった。

【0031】(実施例 8) 実施例 6において、抽出溶媒をクロロホルムからテトラヒドロフランに変更した以外は同様の操作を行った。得られた 3HB ホモポリマーの回収率は 85% であった。

【0032】(実施例 9) 実施例 6 で得られた湿菌体を、乾燥することなく 5.0 g / 1 となるようにテトラヒドロフランに懸濁し、加熱還流下で 5 時間攪拌を行って 3HB ホモポリマーの抽出を行った。この微生物菌体を含む抽出液に、塩化カルシウムを 1.0 g / 1 となるように加えて更に 1 時間攪拌し未溶解細胞残査を凝集させ、これをろ紙 (桐山製作所製、No. 4) を用いて桐山ロートにて吸引ろ過し、凝集菌体残査を分離除去した。この時目詰まりすることなくろ過を行うことが出来た。得られた濾液を、攪拌しながら室温まで冷却し、3HB ホモポリマーの結晶を析出させ、該結晶をろ過により集め減圧下に乾燥した。得られた 3HB ホモポリマーの回収率を計算したところ、96% であった。

率は 81% であった。

【0033】(実施例 10) 実施例 9において、塩化カルシウムを陽イオン性界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドに変更した以外は同様の操作を行った。得られた 3HB ホモポリマーの回収率は 83% であった。

【0034】(実施例 11) 実施例 1において、アルカリゲネス・ユウトロファス AC32 (FERMP-1 5786) をアエロモナス・キャビエ FA440 (寄託番号 FERMBP-3432) に変更した以外は同様の条件で培養し、3HB と 3HH の 2 成分共重合体 (3HB ユニット : 3HH ユニット = 10 : 90 (モル比)) を約 30 重量% 含有した菌体を得た。これを遠心分離処理 (5000 rpm, 10 min) して培養液から分離し、湿菌体とした。この湿菌体を凍結乾燥し、乾燥菌体としたのちに、乾燥菌体で 5.0 g / 1 となるようにクロロホルムに懸濁し、室温で 5 時間攪拌を行って 3HB と 3HH の 2 成分共重合体の抽出を行った。この微生物菌体を含む抽出液に、陽イオン界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを 1.0 g / 1 となるように加えて更に 1 時間攪拌し未溶解細胞残査を凝集させ、これをろ紙 (桐山製作所製、No. 4) を用いて桐山ロートにて吸引ろ過し、凝集菌体残査を分離除去した。この時目詰まりすることなくろ過を行うことが出来た。得られた濾液に、攪拌しながらメタノールを加えて 3HB と 3HH の 2 成分共重合体の結晶を析出させ、該結晶をろ過により集め減圧下に乾燥した。得られた 3HB と 3HH の 2 成分共重合体の回収率を計算したところ、96% であった。

【0035】(比較例 1) 実施例 1において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロライドを添加しなかった以外は同様の操作を行った。ろ過の段階で目詰まりが激しく菌体残渣を分離することができなかった。

【0036】(比較例 2) 実施例 6において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを添加しなかった以外は同様の操作を行った。その結果、ろ過の段階で目詰まりが激しく菌体残渣を分離することができなかった。

【0037】

【発明の効果】本発明によれば、PHA を含有する微生物菌体と抽出溶媒との懸濁液に、2 倍以上の金属塩や界面活性剤を添加するという極めて簡便な操作によって、未溶解細胞残査を凝集させて除去することが可能となり、容易に高純度の PHA が得られるため、本発明は、微生物による PHA の工業的生産の効率向上およびコストの低減に大きく寄与するものである。

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-031489

(43)Date of publication of application : 03.02.1995

(51)Int.CI. C12P 7/62

(21)Application number : 05-196671 (71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 15.07.1993 (72)Inventor : YOKOYAMA MASAKO

(54) SEPARATION OF BIO-POLYESTER FROM BIO-POLYESTER-CONTAINING MICROORGANISM

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for efficiently separating a bio-polyester in a granular state from microbial cells containing the bio-polyester.

CONSTITUTION: This method for separating the granular bio-polyester comprises adding an alkali in an amount of 1mmol-1mol/kg microbial cells to the aqueous suspension of bio-polyester-containing microorganisms, charging the suspension into a pressure-resistant container or preliminarily heating the suspension at 40-100° C and then charging the heated suspension into the pressure-resistant container, and subsequently heating and retaining the charged suspension at 40-100° C for raising the pressure to spout the suspension from the small opening of the container, thus allowing the shearing force of the fluid to act on the microorganism.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.05.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 09.12.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]